

Zmiany w komórkach mikroorganizmów pod wpływem wysokiego ciśnienia*)

EDYTA MALINOWSKA-PAŃCZYK, ILONA KOŁODZIEJSKA

Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej,
ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

Malinowska-Pańczyk E., Kołodziejska I.

High pressure induced changes in microorganisms' cells

Summary

The mechanisms responsible for microorganisms' death under high pressure conditions are still not clear. Pressure in the range of 5-40 MPa does not usually lead to death of cells, but causes changes in their shape, dimensions and motility. In the case of some microorganisms, mainly of moulds and yeast, elongation of the cell may cause injury in the cell wall and therefore lead to their death. Changes in the cytoplasmic membrane permeability are considered to be the main reason for pressure-induced inactivation of microorganisms. According to some authors, inactivation of key enzymes leads to the inhibition of metabolic processes and the death of microorganisms. Pressure influences ribosomes and the biosynthesis of proteins. Some bacteria may be adapted to elevated pressure by regulation of protein expression. Among the new proteins, so-called PIPs (pressure-induced proteins), are identified heat-shock proteins and cold-shock proteins.

Keywords: high pressure, microorganisms

Od kilkunastu lat trwa niesłabnące zainteresowanie tematyką dotyczącą wykorzystania wysokich ciśnień nie tylko do utrwalania żywności, ale również materiałów biologicznych. Wpływ wysokiego ciśnienia na komórki drobnoustrojów jest jednakże bardzo złożony, a efekt działania ciśnienia zależy od wielu czynników, w tym od właściwości drobnoustrojów, ich fazy wzrostu, a także od pH i składu środowiska, w którym się znajdują oraz od parametrów prowadzonego procesu. Mikroorganizmy różnią się opornością na podwyższone ciśnienie. Różnice we wrażliwości pojawiają się już pomiędzy szczepami w obrębie tego samego gatunku.

Mechanizm śmierci mikroorganizmów w warunkach wysokociśnieniowych nie został jeszcze w pełni wyjaśniony. Obecnie wiadomo, że pod wpływem ciśnienia mogą zachodzić zmiany wyglądu i kształtu komórek, utrata integralności ściany i błon komórkowych, jak również denaturacja białek, w tym również enzymatycznych, denaturacja rybosomów, zmiany w materiale genetycznym, hamowanie procesów transkrypcji i syntezy białek. Z opublikowanych prac nie wynika jednoznacznie, które ze zmian są w głównej mierze odpowiedzialne za wrażliwość komórek w warunkach wysokociśnieniowych oraz dlaczego niektóre z nich zachodzą w komórkach badanych szczepów w innych natomiast nie.

Opracowanie jest syntetycznym podsumowaniem aktualnego stanu wiedzy na temat zmian, jakie zachodzą w komórkach mikroorganizmów po działaniu ciśnienia.

Wpływ wysokiego ciśnienia na kształt, struktury oraz składniki wewnątrzkomórkowe mikroorganizmów

Kształt i wielkość komórek, ściana komórkowa i błona cytoplazmatyczna. Ciśnienia rzędu 5-40 MPa zazwyczaj nie prowadzą jeszcze do śmierci komórek, lecz powodują zmiany ich kształtu i wymiarów lub ruchliwości (8, 13, 31). Powyższe zmiany, zależne od szczepu, są zwykle odwracalne. Po działaniu ciśnienia 40 MPa następuje wydłużenie długości komórek, np. *E. coli* z 1-2 μm do 10-100 μm . Ciśnienie rzędu 30-45 MPa powoduje zwiększenie grubości ściany komórkowej oraz oddzielenie jej od błony cytoplazmatycznej. W przypadku niektórych mikroorganizmów, głównie grzybów, wydłużenie komórki może prowadzić do mechanicznego rozerwania naprężonej ściany komórkowej i w efekcie do śmierci komórki (13).

Różnice we wrażliwości mikroorganizmów na działanie wysokiego ciśnienia tłumaczy się m.in. różnicami w budowie ściany komórkowej. Ściana komórkowa bakterii Gram-dodatnich jest stosunkowo gruba (ok. 15-50 nm) i zbudowana jest z kilkuwarstwowej siatki

mureinowej stabilizowanej przez kwasy teichojowe. Natomiast ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych (o grubości 2-10 nm) składa się z jednowarstwowej siatki mureinowej oraz z błony zewnętrznej zbudowanej z białek, fosfolipidów oraz lipopolisacharydów. Z tego względu zmiany zachodzące pod wpływem wysokiego ciśnienia są większe w komórkach bakterii Gram-ujemnych niż bakterii Gram-dodatnich (13, 28). Na skutek uszkodzenia zewnętrznej osłony ściany komórkowej bakterie Gram-ujemne stają się wrażliwe i niezdolne do wzrostu w środowisku selektywnym. Podobnie zachowują się bakterie poddane działaniu zamrażania, szoku termicznego czy suszenia (19).

Uważa się jednak, że główną przyczyną śmierci bakterii pod wpływem zwiększonego ciśnienia są zmiany w błonie cytoplazmatycznej (29). W warunkach ciśnienia atmosferycznego błona cytoplazmatyczna drobnoustrojów ma postać półpłynnej warstwy lipidowej, w której znajduje się ok. 60-70% białek. Pod wpływem wysokiego ciśnienia błona cytoplazmatyczna traci swój półprzepuszczalny charakter, co prowadzi do zakłóceń w selektywnym transporcie. Substancje zewnątrzkomórkowe mogą penetrować do wnętrza komórki, a wewnątrzkomórkowe przechodzą do środowiska zewnętrznego. Wśród substancji opuszczających komórkę znajdują się m.in.: jony potasu, sodu i wapnia, ATP, cukry, kwasy tłuszczowe, estry i aminokwasy (19, 25). Pod wpływem zwiększonego ciśnienia cytoplazma ulega zakwaszeniu (28). Jest to wynikiem zmniejszenia aktywności znajdujących się w błonie ATP-az, odpowiedzialnych za utrzymanie odpowiednich warunków procesów fizjologicznych mikroorganizmów (25, 29).

Działanie zwiększonego ciśnienia powoduje przemianę ciekło-kryształicznego stanu dwuwarstwy fosfolipidowej do bardziej uporządkowanej formy żelu (18). Te zmiany prowadzą do osłabienia oddziaływań białka-lipidy, co z kolei może prowadzić do uwolnienia z błony białek integralnych i peryferyjnych (21). W przypadku bakterii Gram-ujemnych działanie zwiększonego ciśnienia powoduje zanik niektórych białek, w tym transbłonowych poryn, w zewnętrznej błonie otaczającej warstwę mureinową (26).

Białka. W zależności od wielkości ciśnienia może nastąpić w wyniku jego działania zmiana II-, III- i IV-rzędowej struktury białek poprzez wpływ na wiązania wodorowe, jonowe i oddziaływania hydrofobowe. Ciśnienie poniżej 150 MPa w temperaturze pokojowej powoduje dysocjację oligomerycznych białek, czemu zawsze towarzyszy zmniejszenie objętości. Ciśnienie powyżej 150-200 MPa wywołuje znaczące zmiany w strukturze III-rzędowej, rozfałdowanie białek i następnie ich agregację. Niektóre z tych zmian mogą być odwracalne. Do nieodwracalnej denaturacji białek dochodzi po zastosowaniu ciśnienia rzędu 300-700 MPa (17, 21).

Hashizume i wsp. (11) stwierdzili podobieństwo pomiędzy przebiegiem krzywej inaktywacji mikroor-

ganizmów oraz denaturacji białek w zależności od ciśnienia. Może to oznaczać, że śmierć drobnoustrojów wiąże się również z denaturacją kluczowych enzymów i wskutek tego z zahamowaniem podstawowych przemian metabolicznych.

Aktywność enzymatyczna. Wysokie ciśnienie, wpływając na strukturę białek enzymatycznych, powoduje utratę lub zwiększenie ich biologicznej aktywności, a tym samym opóźnia lub przyspiesza liczne reakcje enzymatyczne w komórkach mikroorganizmów. Zmiany w białku enzymatycznym zachodzące pod wpływem zwiększonego ciśnienia mogą być odwracalne lub nieodwracalne (13). Ciśnienie ok. 100 MPa może aktywować niektóre enzymy wskutek zwiększenia przepuszczalności błony cytoplazmatycznej i ułatwienia kontaktu enzymu z substratem (12).

Za przyczynę śmierci komórek roślinnych uważa się inaktywację ATP-az oraz enzymów z grupy oksydoreduktaz, tj. peroksydazy, oksydazy polifenolowej, lipoksygenazy. W wyniku działania podwyższonego ciśnienia następuje utrata aktywności tych enzymów, co prowadzi do wielu niekontrolowanych reakcji działających destrukcyjnie na komórkę (13).

Rybosomy. Ciśnienie w znaczący sposób działa na rybosomy, a proces biosyntezy białka jest bardzo wrażliwy na zmiany ciśnienia. Pod wpływem ciśnienia 40-60 MPa następuje dysocjacja rybosomów na podjednostki (10). Dysocjacja rybosomów w polisomie do podjednostek zachodzi wolniej niż w przypadku wolnych rybosomów. Wrażliwość polisomów bakteryjnych na podwyższone ciśnienie determinuje podjednostka 30S, podczas gdy podjednostka 50S nie odgrywa tu znaczącej roli. Hamowanie procesu translacji występuje pod wpływem ciśnienia rzędu 70 MPa (13). Po powrocie do ciśnienia atmosferycznego część rybosomów ulega odtworzeniu, a dzięki temu proces translacji znów przebiega prawidłowo. Śmierć komórki następuje wtedy, gdy nie jest możliwe odtworzenie potrzebnej liczby prawidłowo funkcjonujących rybosomów (24).

Rybosomy stabilizowane są w obecności jonów Mg (II). Obniżenie stężenia jonów Mg (II) do 1-3 mM prowadzi do zahamowania procesu biosyntezy białek już przy ciśnieniu 70 MPa. Ciśnienie, poprzez zmianę przepuszczalności błony cytoplazmatycznej, powoduje utratę tych jonów, a tym samym destabilizację struktury rybosomu. Jeśli powyższe zakłócenia utrzymują się przez dłuższy czas, to degeneracyjne zmiany stają się nieodwracalne i następuje śmierć komórki. Dodatek MgCl₂ do środowiska, w którym komórki poddawane są następnie działaniu ciśnienia, wywiera ochronny wpływ na stabilność rybosomów (13, 24).

W warunkach ciśnienia atmosferycznego obie podjednostki rybosomów łączą się z mRNA tworząc stabilny układ umożliwiający syntezę białek. Zahamowanie procesu biosyntezy białek poprzez wysokie ciśnienie polega na hamowaniu wiązania pomiędzy mRNA a aminoacylo-tRNA w rybosomie. Rybosomy związa-

ne z mRNA i tRNA są bardziej stabilne i mniej wrażliwe na działanie podwyższonego ciśnienia (13).

Wysokie ciśnienie hamuje syntezę wszystkich białek komórkowych uczestniczących w przenoszeniu aminokwasów na tRNA, a następnie na kompleks mRNA (10).

DNA

Kwasy nukleinowe są bardziej odporne na działanie podwyższonego ciśnienia niż białka (16). Ta różnica w oporności na wysokie ciśnienie pomiędzy DNA a białkami wynika z większej ilości wiązań wodorowych stabilizujących strukturę DNA (13, 31).

Podwyższone ciśnienie wpływa natomiast na białka uczestniczące w procesie replikacji i naprawy DNA, przyczyniając się w ten sposób do zmniejszenia szybkości lub całkowitego zahamowania biosyntezy białek w komórce. Wg Mackey i wsp., (20), pod wpływem ciśnienia materiał genetyczny staje się bardziej podatny na działanie endonukleaz. Proces ten jest w wielu przypadkach odwracalny, jednak wymaga obecności enzymu odpowiedzialnego za ligację DNA. Przy zbyt wysokim ciśnieniu ligaza jest inaktywowana i proces naprawy uszkodzonego DNA zostaje całkowicie zahamowany (28).

Gyraza, należąca do drugiej grupy topoisomeraż, może powodować powstawanie nowych skręceń DNA lub zmianę kierunku skrętu nici DNA (+) w (-). Enzym ten jest niezbędny do swobodnego ruchu widełek replikacyjnych, więc jego inaktywacja wiąże się z zahamowaniem procesu replikacji. Ciśnienie 50-80 MPa zmienia strukturę gyrazy i obniża jej aktywność, przez co traci ona zdolność zmiany kierunku skręcania nici DNA (9).

Czynniki warunkujące oporność drobnoustrojów na wysokie ciśnienie

Indukcja białek szoku. Pod wpływem ciśnienia w zakresie 30-55 MPa niektóre bakterie mogą ulegać adaptacji do warunków wysokociśnieniowych poprzez zmianę ekspresji białek. Nowo syntetyzowane białka, tzw. PIPs (pressure-induced proteins), budową przypominają białka indukowane w czasie szoku cieplnego lub szoku chłodniczego, są jednak od nich bardziej odporne na ciśnienie i skutecznie zwiększają stabilność rybosomów (31). Stwierdzono, że działanie ciśnienia 53 MPa na komórki *E. coli* indukuje syntezę wielu nowych białek. Wśród 55 wyizolowanych białek były obecne białka rybosomalne, wiele białek o niezidentyfikowanej funkcji, a także białka szoku cieplnego i chłodniczego. Białka te, nazywane opiekuńczymi, pozwalają komórkom poddanym czynnikom stresowym przystosować się do tych warunków. Wielkość zastosowanego ciśnienia wpływa na liczbę tych białek w komórce (31).

Synteza białek szoku cieplnego jest indukowana już w ciągu minuty od przeniesienia komórek *E. coli* z 28 do 50°C, podczas gdy indukcja tych białek poprzez

działanie wysokiego ciśnienia następuje po dłuższym czasie od 60 do 90 minut (31). Z kolei w komórkach *L. monocytogenes* LO28 poddanych działaniu ciśnienia 200 MPa przez 10 min. stwierdzono obecność białek identycznych jak w przypadku szoku chłodniczego. Głównym sygnałem dla komórki do indukcji tych białek w niskich temperaturach oraz pod wpływem wysokiego ciśnienia jest częściowa inaktywacja rybosomów (24). Stwierdzono również zwiększenie oporności komórek poddanych uprzednio stresowi chłodniczemu na działanie wysokiego ciśnienia. Prawdopodobnie jest to rezultatem zaadaptowania rybosomów do warunków chłodniczych, dzięki czemu stają się one mniej wrażliwe na niszczący efekt działania ciśnienia (32).

Wśród drobnoustrojów szczególnie wrażliwe na działanie wysokiego ciśnienia są organizmy eukariotyczne. Działanie ciśnienia powyżej 150 MPa na drożdże *S. cerevisiae* powoduje zniszczenie integralności błony komórkowej i struktur białkowych, czego rezultatem jest śmierć komórek. Stwierdzono jednak, że uprzednie zastosowanie krótkotrwałego szoku cieplnego pozwala komórkom drożdży przeżyć działanie wysokiego ciśnienia. Wzrost przeżywalności jest spowodowany akumulacją trehalozy i produkcją białek Hsp104 (14). Można uznać, że wysoka temperatura i wysokie ciśnienie są fizycznie analogami, dlatego też te czynniki mogą powodować podobne zmiany w komórkach mikroorganizmów (14).

Drugim czynnikiem przyczyniającym się do przeżywania drożdży w warunkach podwyższonego ciśnienia są trehalazy. Enzymy te kodowane są przez geny *nth1* i *nth2*. Gen *nth1* kodujący obojętną trehalazę I jest odpowiedzialny za hydrolizę trehalozy, natomiast rola genu *nth2* kodującego obojętną trehalazę II, wykazującego w 77% identyczność sekwencji nukleotydowej z genem *nth1*, nie jest wyjaśniona. Pod wpływem ciśnienia 180 MPa przez 2 godziny komórki *S. cerevisiae* w stacjonarnej fazie wzrostu, pozbawione genu kodującego trehalazę I wykazywały mniejszą barotolerancję niż komórki szczepu dzikiego typu (15). Wprowadzenie genu *nth1* za pomocą plazmidu do zmutowanych komórek przywróciło barotolerancję, co potwierdza rolę trehalazy I w przeżywaniu drożdży w warunkach podwyższonego ciśnienia. Mutant pozbawiony genu *nth2* posiadał oporność podobną do komórek dzikiego typu. Wyniki te sugerują, że trehalaza I ma znaczący wpływ na przeżywanie drożdży w warunkach wysokiego ciśnienia natomiast trehalaza II może jedynie w pośredni sposób wpływać na efekt barotolerancyjny (15).

Aktywność czynnika sigma^S. Różnice wrażliwości drobnoustrojów na wysokie ciśnienie pojawiają się nawet pomiędzy szczepami w obrębie tego samego gatunku. Robey i wsp. (27) wykazali duże zróżnicowanie we wrażliwości na działanie wysokiego ciśnienia w obrębie szczepów *E. coli* O157:H7. Wśród badanych szczepów najbardziej ciśnieniooporne były

C9490 i 30-2C4, które przeżywały warunki 500 MPa przez 5 min. Populacje szczepów NCTC 12079 i W2-2 zmniejszały się w tych samych warunkach o 3-4 rzędy wielkości, natomiast szczepy H1071 i O124, NCTC 8003 były najmniej odporne, gdyż ich liczba zmniejszyła się o 5-6 rzędów wielkości. Ponadto różnice w ciśnieniooporności zaobserwowano jedynie w stacjonarnej fazie wzrostu. Prawdopodobnie oporność na inaktywację przez wysokie ciśnienie jest ściśle związana z uruchomieniem mechanizmów obronnych w chwili przejścia komórek do fazy stacjonarnej. Według autorów, za różną oporność badanych szczepów odpowiedzialna jest zmienność w obszarze genu *rpoS* i jest ona zależna od aktywności białka RpoS. Białko to jest podjednostką sigma^S, kodowaną przez gen *rpoS*. Podczas drastycznej zmiany warunków życia komórki bakteryjnej zastępuje ona standardową podjednostkę sigma i poprzez zmianę specyficzności polimerazy RNA uczestniczy w indukcji genów determinujących przejście komórek do stacjonarnej fazy wzrostu. Mimo że podczas tego procesu ilość produkowanych białek ulega zmniejszeniu, dochodzi jednak do syntezy licznych nowych białek, wymagających do indukcji czynnika sigma^S. Czynnikiem sigma^S polimerazy RNA kontroluje transkrypcję wielu genów umożliwiających komórkom przeżywanie warunków głodu i stresu.

Robey i wsp. (27) stwierdzili, że aktywność białka RpoS w momencie wejścia do stacjonarnej fazy wzrostu była największa w szczepach opornych na działanie wysokiego ciśnienia i nieznacznie wzrastała w czasie kolejnych godzin hodowli. W przypadku szczepów najmniej ciśnienioopornych aktywność białka RpoS w stacjonarnej fazie wzrostu była znacznie mniejsza w porównaniu z aktywnością tego białka w szczepach niewrażliwych na wysokie ciśnienie. Sugeruje to, że duża aktywność białka RpoS determinuje zdolność do przeżycia w warunkach podwyższonego ciśnienia.

Stwierdzono, że aktywność białka RpoS zmienia się zależnie od sekwencji nukleotydów w genie kodującym to białko. Na podstawie analizy sekwencyjnej genów *rpoS* *E. coli* O157:H7 wykazano następujące różnice: w przypadku szczepu C9490, najmniej wrażliwego na działanie ciśnienia, w pozycji -96/-98 występował kodon kodujący leucynę, podczas gdy pozostałe szczepy zawierały w tym miejscu sekwencję odpowiadającą glutaminie. U szczepów średnioopornych, np. W2-2 w pozycji 214-216 występował kodon kodujący prolinę zamiast treoniny. Natomiast w przypadku szczepu najbardziej wrażliwego na działanie ciśnienia H1071 wystąpił wczesny sygnał terminacji (kodon stop) w pozycji 442-444. Punktowe zmiany aminokwasowe są przyczyną różnic w aktywności białka RpoS. Jednakże skrócenie długości łańcucha białka RpoS jest odpowiedzialne za jeszcze większe zmniejszenie jego aktywności, co niewątpliwie jest przyczyną najskuteczniejszej inaktywacji szczepu H1071 przez wysokie ciśnienie (27).

Adaptacja mikroorganizmów do wysokiego ciśnienia

W procesie ewolucji w środowisku głębokomorskim wykształcone zostały bakterie ekstremofilne zaadaptowane do życia w warunkach wysokiego ciśnienia i niskiej temperatury (4). Głębokomorskie bakterie, nazywane barofilami lub też piezofilami, charakteryzują się szybszym wzrostem w warunkach wysokiego ciśnienia niż w ciśnieniu atmosferycznym (1, 4, 23). Barofilne bakterie występują nawet na głębokości poniżej 2000 m, gdzie panuje nie tylko wysokie ciśnienie i niska temperatura, ale także brak substancji odżywczych i światła. W tych warunkach piezofile mogą rosnąć w ciśnieniu powyżej 100 MPa, lecz górny limit wysokiego ciśnienia umożliwiający ich przetrwanie nie jest znany (4).

Mikroorganizmy, które zaadaptowały się do życia w warunkach wysokiego ciśnienia, charakteryzują się unikatowym mechanizmem ekspresji genów, regulowanym przez wysokie ciśnienie, dzięki czemu wytwarzają one białka, które umożliwiają im funkcjonowanie w tak skrajnych warunkach (23).

Regulacja ekspresji genów przez wysokie ciśnienie u piezofili. W zależności od warunków ciśnienia i temperatury piezofile również regulują ekspresję genów poprzez syntezę specyficznych czynników sigma. U bakterii *Shewanella* sp. DSS12 zidentyfikowano operon ORF1 i ORF2 regulowany przez wysokie ciśnienie, zawierający pięć miejsc promotorowych kontrolowanych przez czynniki transkrypcyjne. W obrębie operonu scharakteryzowano dwa regiony występujące obok siebie – region A i B. Region A zawiera sekwencję promotorową rozpoznawaną przez holoenzym złożony z polimerazy RNA i czynnika sigma⁵⁴. Wiązanie się tego kompleksu do regionu A zachodzi zarówno w warunkach ciśnienia atmosferycznego, jak i 50 MPa, lecz ilość czynnika sigma⁵⁴ jest większa w wyższym ciśnieniu. W regionie B znajdują się trzy miejsca promotorowe, o sekwencji nie znalezionej dotąd w żadnym mikroorganizmie. Region ten zawiera unikatową sekwencję AAGGTAAB (region B2), która powtarza się tandemowo 13 razy, oraz położoną poniżej sekwencję palindromową AGTTAAAGATTA-AACT (region B3). Według autorów może to wskazywać, że szczep ten posiada nieznane dotąd czynniki sigma, których synteza indukowana jest przez wysokie ciśnienie. W zależności od warunków ciśnienia czynniki te łączą się z polimerazą RNA, dzięki czemu jest ona zdolna do rozpoznawania tych miejsc promotorowych (22, 23).

Dużą rolę w stabilizacji jednoniciowego DNA powstającego na skutek rozplatania heliksu DNA podczas inicjacji replikacji, mają białka SSB (single-strand binding proteins). Pod wpływem działania ciśnienia białka SSB z piezowrażliwego szczepu *Shewanella* szybciej ulegają dysocjacji niż białka z mikroorganizmów piezotolerantnych lub piezofilnych. Białka SSB

głębokomorskich szczepów *Shewanella* zawierają w centralnym regionie, charakteryzującym się zmiennością, obniżoną ilość reszt proliny i glicyny, co przypuszczalnie zmniejsza ich elastyczność i zapewnia stabilność tego białka w warunkach wysokiego ciśnienia (5).

Regulacja płynności błon. U mikroorganizmów piezofilnych w odpowiedzi na wysokie ciśnienie następują zmiany w składzie ich błony, co pozwala na regulację jej przepuszczalności. Łańcuchy kwasów tłuszczowych układają się „ciaśniej” względem siebie, dzięki czemu ruchliwość cząsteczek w błonie jest ograniczona i staje się ona mniej wrażliwa na działanie ciśnienia. W warunkach wysokiego ciśnienia, jak również niskiej temperatury bakterie piezofilne zwiększają syntezę nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonach komórkowych, co pozwala na utrzymanie jej prawidłowej płynności i lepkości (3). Największą rolę w adaptacji mikroorganizmów do warunków środowiska głębokomorskiego poprzez utrzymywanie prawidłowej płynności błony odgrywają jednonienasycone kwasy tłuszczowe (3). Nie zaobserwowano natomiast znaczących różnic w zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (1).

W procesie biosyntezy nienasyconych kwasów tłuszczowych enzym syntetaza β -ketoacylo-ACP (KAS II), produkt genu *fabF*, katalizuje elongację palmitoil-ACP (16:1) do *cis*-wakcenylo-ACP (18:1). KAS II jest także kluczowym enzymem uczestniczącym w regulacji zawartości kwasu *cis*-wakcenylo-ACP w komórkach głębokomorskiej bakterii *Photobacterium profundum* SS9, dzięki czemu mogą one rosnąć w tych warunkach. Aktywność katalityczna enzymu KAS II szczepu *Photobacterium profundum* SS9 zwiększa się w warunkach podwyższonego ciśnienia, podobnie jak w przypadku komórek bakterii mezofilnych poddanych szokowi chłodnicemu (5). Mimo że gen *fabF* ze szczepu SS9 nie jest transkrypcyjnie regulowany przez wysokie ciśnienie, istnieje prawdopodobieństwo pewnych zmian posttranslacyjnych wpływających na wzrost aktywności enzymu KAS II i zarazem większą syntezę kwasów 18:1 (2).

W charakterystycznej dla bakterii Gram-ujemnych przepuszczalnej selektywnie zewnętrznej błonie występują kanały białkowe zwane porynami, umożliwiające transport substancji odżywczych pomiędzy środowiskiem zewnętrznym i periplazmą. Specyficzne środowisko głębokomorskie, które jest ubogie w składniki odżywcze, powoduje, że mikroorganizmy rosące w tych warunkach posiadają białka błonowe inne niż wówczas, gdy znajdują się w warunkach ciśnienia atmosferycznego. Ekspresja genów kodujących białka błony jest u bakterii głębin morskich regulowana przez wysokie ciśnienie. Białka błony OmpH są produkowane w największej ilości, kiedy komórki *Photobacterium* sp. SS9 rosną w zakresie ich optymalnego ciśnienia około 28 MPa, podczas gdy produkcja białka OmpL jest maksymalna przy ciśnieniu 0,1 MPa

(1, 7). Przeniesienie bakterii piezofilnych z ciśnienia atmosferycznego do warunków podwyższonego ciśnienia pociąga za sobą zwiększenie produkcji zewnętrznego białka błony OmpH i zmniejszenie produkcji białka OmpL. Komórki zawierające mutacje w obrębie genu *ompH* nie stają się jednak wrażliwe na działanie wysokiego ciśnienia, stąd hipoteza, że obecność OmpH nie jest czynnikiem koniecznym do utrzymania zdolności do wzrostu w ekstremalnych warunkach (6).

Geny kodujące białka OmpH i OmpL są transkrypcyjnie regulowane przez białko ToxR, na którego aktywność wpływa białko ToxS. Białka te zostały po raz pierwszy odkryte w komórkach *Vibrio cholerae* jako odpowiedź na zmiany temperatury, ciśnienia osmotycznego i pH (5). W zależności od warunków środowiska białko ToxS tak zmienia aktywność białka ToxR, iż pełni ono funkcję aktywatora genu *ompL* lub represora genu *ompH* (1, 30).

W przypadku bakterii barofilnych oporność na wysokie ciśnienie regulowana jest również przez inne geny, np. należące do operonu *rpoE*. W skład operonu *rpoE* wchodzi gen kodujący czynnik sigma oraz geny *rseA*, *rseB* i *rseC*. Produkty genów *rseA* i *rseB* regulują aktywność białka RpoE w zależności od warunków panujących w obrębie błon i periplazmy, natomiast białko RseC funkcjonuje niezależnie od RpoE. RseC i inne spokrewnione białka funkcjonują jako białka transbłonowe służące do transportu elektronów w procesach biosyntezy np. tyminy. Mutanty *Photobacterium* sp. SS9 z niską ekspresją *rseC* były wrażliwe zarówno na działanie wysokiego ciśnienia, jak i niskiej temperatury, ponieważ oba te czynniki wpływają na stan błony cytoplazmatycznej. Powyższe przykłady wskazują, że gen *rseC* jest konieczny do piezo- i psychroadaptacji jedynie w przypadku organizmów głębokomorskich (5). Stwierdzono również, że brak ekspresji genu *rseA*, *rseB* lub *rseC* zmniejsza transkrypcję genu *ompH*, ale przyczyny tego efektu pozostają niewyjaśnione. Prawdopodobnie istnieją inne dodatkowe geny, których aktywność znajduje się pod kontrolą RpoE (5).

Podsumowanie

Wpływ wysokiego ciśnienia na komórki drobnoustrojów jest złożony, a efekt działania ciśnienia zależy od bardzo wielu czynników. Mikroorganizmy różnią się opornością na podwyższone ciśnienie. Przyczyny śmierci mikroorganizmów normalnie rosnących w warunkach ciśnienia atmosferycznego, poddanych działaniu wysokiego ciśnienia nie zostały jeszcze dokładnie wyjaśnione. Z pewnością niektóre ze zmian następują jednocześnie, inne natomiast pociągają za sobą kolejne, co w ostateczności może doprowadzić do śmierci. Poznanie wszystkich zjawisk zachodzących w komórkach mikroorganizmów pod wpływem wysokiego ciśnienia, a także wpływu różnych czynników na ich przeżywalność w tych warunkach pozwoli na optymalne wykorzystanie techniki wysokociśnien-

niowej w biotechnologii, technologii żywności i innych pokrewnych dziedzinach nauki.

Piśmiennictwo

1. Abe F., Kato Ch., Horikoshi K.: Pressure-regulated metabolism in microorganisms. *Trends Microbiol.* 1999, 7, 447-453.
2. Allen E. E., Bartlett D. H.: FabF is required for piezoregulation of cis-vaccenic acid levels and piezophilic growth of the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* strain SS9. *J. Bacteriol.* 2000, 182, 1264-1271.
3. Allen E. E., Facciotti D., Bartlett D. H.: Monounsaturated but not polyunsaturated fatty acids are required for growth of the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 at high pressure and low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 1710-1720.
4. Bartlett D. H.: Microbial life at high pressures. *Sci. Progr.* 1992, 76, 479-496.
5. Bartlett D. H.: Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochim. Biophys. Acta* 2002, 1595, 367-381.
6. Bartlett D. H., Kato C., Horikoshi K.: High pressure influences on gene and protein expression. *Res. Microbiol.* 1995, 146, 697-706.
7. Bartlett D. H., Welch T. J.: ompH gene expression is regulated by multiple environmental cues in addition to high pressure in the deep-sea bacterium *Photobacterium* species strain SS9. *J. Bacteriol.* 1995, 177, 1008-1016.
8. Bidle K. A., Bartlett D. H.: RecD function is required for high-pressure growth of a deep-sea bacterium. *J. Bacteriol.* 1999, 181, 2330-2337.
9. Chilukuri L. N., Forest P. A. G., Bartlett D. H.: High pressure modulation of *Escherichia coli* DNA gyrase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 239, 552-556.
10. Groß M., Jaenicke R.: Pressure-induced dissociation of tight couple ribosomes. *FEBS Lett.* 1990, 267, 239-241.
11. Hashizume C., Kimura K., Hayashi R.: Kinetic analysis of yeast inactivation by high pressure treatment at low temperatures. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1995, 59, 1455-1458.
12. Hendrickx M., Ludikhuyze L., Van den Broeck I., Weemaes C.: Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Food Sci. Technol.* 1998, 9, 197-203.
13. Hoover D. G., Metrick C., Papineau A. M., Farkas D. F., Knorr D.: Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technol.* 1989, 43, 99-107.
14. Iwahashi H., Obuchi K., Fujii S., Komatsu Y.: Effect of temperature on the role of Hsp104 and trehalose in barotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 1997, 416, 1-5.
15. Iwahashi H., Obuchi K., Nwaka S.: Evidence for contribution of neutral trehalase in barotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 5182-5185.
16. Landau J. V.: Protein and nucleic acid synthesis in *Escherichia coli*: Pressure and temperature effects. *Science* 1969, 153, 1273-1274.
17. Lullien-Pellerin V., Balny C.: High-pressure as a tool to study some proteins properties: conformational modification, activity and oligomeric dissociation. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2002, 3, 209-221.
18. Macdonald A. G.: Effects of high hydrostatic pressure on natural and artificial membranes. High Press. Biotechnol. Hayashi R., Heremans K., Massson R. (ed.), Colloque INSERM John Libbey Eurotext Ltd. 1992, 224, 67-75.
19. Mackey B. M.: Injured bacteria. [in:] Lund B. M., Baird-Parker A., Gould G. M. (eds): *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, MD 2000, 315-341.
20. Mackey B. M., Forestiere K., Isaacs N. S., Stenning R., Brooker B.: The effect of high hydrostatic pressure on *Salmonella thompson* and *Listeria monocytogenes* examined by electron microscopy. *Letts. Appl. Microbiol.* 1994, 19, 429-432.
21. Mozhaev V. V., Heremans K., Frank J., Mansson P., Balny C.: Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* 1994, 12, 493-501.
22. Nakasone K., Ikegami A., Kato C., Usami R., Horikoshi K.: Analysis of cis-elements upstream of the pressure-regulated operon in the deep-sea barophilic bacterium *Shewanella violacea* strain DSS12. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 176, 351-356.
23. Nakasone K., Ikegami A., Kato C., Usami R., Horikoshi K.: Mechanisms of gene expression controlled by pressure in deep-sea microorganisms. *Extremophiles* 1998, 2, 149-154.
24. Niven G. W., Miles Ch. A., Mackey B. M.: The effects of hydrostatic pressure on ribosome conformation in *Escherichia coli* an in vitro study using differential scanning calorimetry. *Microbiol.* 1999, 145, 419-425.
25. Pagan R., Mackey B.: Relationship between membrane damage and cell death in pressure treated *Escherichia coli* cells: differences between exponential- and stationary-phase cells and variation among strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 2829-2834.
26. Ritz M., Freulet M., Orange N., Federighi M.: Effects of high hydrostatic pressure on membrane proteins of *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* 2000, 55, 115-119.
27. Robey M., Benito A., Hutson R. H., Pascual C., Park S. F., Mackey B. M.: Variation in resistance to high hydrostatic pressure and rpoS heterogeneity in natural isolates of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67, 4901-4907.
28. Smelt J. P. P. M.: Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci. Technol.* 1998, 9, 152-158.
29. Ulmer H. M., Ganzle M. G., Vogel R. F.: Effects of high hydrostatic pressure on survival and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* TMW1460. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 3966-3973.
30. Welch T. J., Bartlett D. H.: Identification of a regulatory protein required for pressure-responsive gene expression in the deep-sea bacterium *Photobacterium* species strain SS9. *Mol. Microbiol.* 1998, 27, 977-985.
31. Welch T. J., Farewell A., Neidhardt F. C., Bartlett D. H.: Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *J. Bacteriol.* 1993, 175, 7170-7177.
32. Wemekamp-Kamphuis H. H., Karatzas A. K., Wouters J. A., Abee T.: Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 456-463.

Adres autora: dr hab. inż. Iłona Kołodziejka, ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk; e-mail: i.kolodziejka@chem.pg.gda.pl